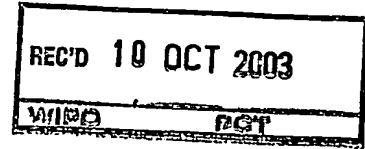


Rec'd PCT/PTO 18 FEB 2005

10/525714
PCT/JP03/10523

20.08.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 0 月 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 9 4 7 9 6
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 2 9 4 7 9 6]

出 願 人 ソニー株式会社
Applicant(s):

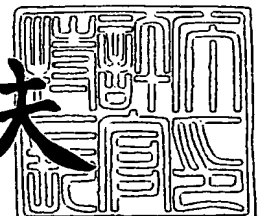
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2 0 0 3 年 9 月 2 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 0290591202

【提出日】 平成14年10月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
ソニー株式会社内

【氏名】 瀬川 雄司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
ソニー株式会社内

【氏名】 眞峯 隆義

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
ソニー株式会社内

【氏名】 坂本 安広

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
ソニー株式会社内

【氏名】 由尾 啓

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
ソニー株式会社内

【氏名】 山本 拓郎

【特許出願人】

【識別番号】 000002185

【氏名又は名称】 ソニー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100112874

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 薫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 076005

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション検出部とセンサーチップ及びハイブリダイゼーション方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を有する標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、

前記反応領域に配置された対向電極と、

前記対向電極間に点在するように配設された浮遊電極と、を備えるハイブリダイゼーション検出部。

【請求項 2】 前記浮遊電極は、不均一電界を形成できる形状を備えることを特徴とする請求項 1 記載のハイブリダイゼーション検出部。

【請求項 3】 前記浮遊電極の電極表面は、前記対向電極の電極表面よりも狭小に形成されていることを特徴とする請求項 1 記載のハイブリダイゼーション検出部。

【請求項 4】 前記浮遊電極の表面が、前記検出用ヌクレオチド鎖を固定できる表面処理が施されていることを特徴とする請求項 1 記載のハイブリダイゼーション検出部。

【請求項 5】 前記対向電極が、平行に配置されていることを特徴とする請求項 1 記載のハイブリダイゼーション検出部。

【請求項 6】 請求項 1 記載のハイブリダイゼーション検出部を少なくとも備えることを特徴とするセンサーチップ。

【請求項 7】 前記対向電極によって形成される電界が、交流であることを特徴とする請求項 6 記載のセンサーチップ。

【請求項 8】 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、前記反応領域に配置された対向電極と、前記対向電極間に配設された複数の浮遊電極と、を備えた検出部を用いて、

前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記検出用

ヌクレオチド鎖を伸長状態とし、この伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を前記対向電極及び前記浮遊電極の局所的な表面部位に生じる不均一電界で誘電泳動して、前記浮遊電極の前記表面部位に固定させる手順と、

前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記標的ヌクレオチド鎖を伸長状態にして、前記浮遊電極の前記表面部位に固定された伸長状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせる手順と、

を備えるハイブリダイゼーション方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAチップ等のセンサーチップに好適に利用できるハイブリダイゼーション検出部に係わる技術に関する。より詳細には、ハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域において、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を走査電極間に整列固定させることによって、ハイブリダイゼーション効率の向上を図る技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

まず、本発明の一般的な従来技術を以下説明する。現在、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、「DNAチップ」と総称。）と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板が、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用され始めている。

【0003】

このDNAチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数のDNAオリゴ鎖やcDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。

【0004】

DNAチップによる解析手法の一例を簡潔に説明すれば、ガラス基板やシリコン基板上に固相化されたDNAプローブに対して、細胞、組織等から抽出したmRNAを逆転写PCR反応等によって蛍光プローブdNTPを組み込みながらPCR増幅し、前記基板上においてハイブリダイゼーションを行い、所定の検出器で蛍光測定を行うという手法である。

【0005】

ここで、DNAチップは二つのタイプに分類できる。第1のタイプは、半導体露光技術を応用したフォトリソグラフィーの技術を用いて、所定の基板上に直接オリゴヌクレオチドを合成していくものであり、アフィメトリクス社（Affymetrix社）によるものが代表的である（例えば、特許文献1参照。）。この種のチップは、集積度は高いが、基板上でのDNA合成には限界があつて、数十塩基程度の長さである。

【0006】

第2のタイプは、「スタンフォード方式」とも称されるもので、先割れピンを用いて、予め用意されたDNAを基板上に分注・固相化していくことによって作製されるものである（例えば、特許文献2参照。）。この種のチップは、集積度は前者に比べて低いが、1kb程度のDNA断片を固相化できるという利点がある。

【0007】

続いて、非特許文献1には、対向電極間に配列された浮遊電極（floating potential electrodes）に形成される電界の作用によって、DNAを電極表面に固定する技術（DNA immobilization methods）が開示されている。

【0008】

【特許文献1】

特表平4-505763号公報

【特許文献2】

特表平10-503841号公報

【非特許文献1】

IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRY APPLICATIONS, VOL. 31, No. 3 MAY/JUNE 1995, P 451

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

まず、上記した従来の一般的なDNAチップ技術では、検出表面部位（スポット部位）に固定化されたDNAプローブ等の検出用ヌクレオチド鎖は、ブラウン運動の作用でランダムコイル状に絡まったり、丸まったり等しており、また、検出表面においてその集積密度に偏りがあった。このため、標的ヌクレオチド鎖とのハイブリダイゼーションの際には立体障害が発生するので、ハイブリダイゼーションの効率が悪く、反応にも長時間を要し、更には、擬陽性又は偽陰性を示してしまう可能性もあるという基本的な技術的課題があった。

【0010】

このため、ハイブリダイゼーションの効率を向上させるために、既存のDNAチップの検出表面領域（スポット領域）に対して、DNAを、立体障害が起き難いと予測される直鎖状構造で固定することを実現するべく、前記非特許文献1に開示されたDNA固定技術を応用し、DNAチップの検出表面領域に、対向電極と該対向電極間に浮遊電極を配列しておき、試料溶液に電界をかけて浮遊電極表面にDNAを固定することが考えられる。しかし、前記DNA固定技術では、対向電極の間に該対向電極と同長の浮遊電極を単に配置した構成であるので、浮遊電極表面に形成される不均一電界の量や密度が低く、固定されるDNAの量が充分でないため、ハイブリダイゼーション効率の向上が充分に図れないことが予測された。

【0011】

そこで、本発明は、ハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域に、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を均密に固定できるように工夫することによって、検出用ヌクレオチド鎖と標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーション効率の向上を図ることを主な目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

上記技術的課題を解決するために、まず、本願においては、検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を有する標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、前記反応領域に配置された対向電極と、前記対向電極間に点在するように配設された複数の浮遊電極と、を備えるハイブリダイゼーション検出部を提供する。

【0013】

前記対向電極の配置構成は特に限定しないが、反応領域に平行に配置された構成を採用することによって、対向電極に挟まれた反応領域全体に、電界を均一かつ高密度に形成することができ、これにより反応領域に存在する各ヌクレオチド鎖を電気力線に沿って平行に伸長させることができる。

【0014】

ヌクレオチド鎖の伸長は、1MV/m程度の高周波電界を印加すると、ヌクレオチド鎖（リン酸イオン等を備えるヌクレオチド鎖の陰電荷とイオン化した水素原子の陽電荷で構成される多数の分極ベクトルからなるヌクレオチド鎖）に誘電分極が生じ、その結果、ヌクレオチド分子が電界と平行に直線状に引き伸ばされるとい原理に基づいている。

【0015】

伸長されたヌクレオチド鎖は、塩基同士が重層することが無くなる結果、反応時の立体障害がなくなって、相補性のある塩基配列同士の会合（水素結合）の確率をより高めることができ、近在するヌクレオチド鎖とのハイブリダイゼーション反応が円滑に行われるようになる。

【0016】

本発明において、上記浮遊電極は、電気力線が一部に集中する箇所を反応領域内に多数形成する役割を果たし、当該箇所に検出用ヌクレチド鎖（の末端）を固定する役割を果たす。この浮遊電極を前記対向電極間の反応領域に点在するように配設する構成を採用することによって、電気力線が集中する箇所を、前記反応領域内に均一かつ高密度で設けることができる。また、浮遊電極を反応領域に点在させる構成によって、反応領域中のヌクレオチド鎖が自由に移動できるという

利点がある。

【0017】

浮遊電極の形態は特に限定しないが、電界（電気力線）が集中し易く、かつヌクレオチド鎖が固定し易い形態であるという観点から、円弧状又は多角形状の表面形状を備える浮遊電極、即ち不均一電界を形成できる形状を備える浮遊電極を採用することができる。また、浮遊電極の電極表面は、前記対向電極の電極表面よりも狭小に形成することによって、浮遊電極の電極表面に電界が集中し易くなり、不均一電界が形成されやすくなるので好適である。更には、浮遊電極の表面を、前記検出用ヌクレオチド鎖を固定できる表面処理を施しておくことによって、前記検出用ヌクレオチド鎖の固定作業を、確実に行うことができる。

【0018】

次に、本願では、上記ハイブリダイゼーション検出部を少なくとも備えるセンサーチップを提供する。より具体的には、検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、前記反応領域に配設された対向電極と、前記対向電極間に配置された複数の浮遊電極と、を備え、前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記検出用ヌクレオチド鎖を伸長状態にし、この伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を前記対向電極及び前記浮遊電極の局所的な表面部位に生じる不均一電界で誘電泳動させて、前記対向電極及び前記浮遊電極の前記表面部位に固定させることが可能なセンサーチップを提供する。

【0019】

このセンサーチップによれば、反応領域に滴下されて分散し、ブラウン運動によってランダムコイル状に絡み合った形態となっている（ハイブリダイゼーションには適さない形態の）検出用ヌクレオチド鎖を、伸長させてハイブリダイゼーションし易い直鎖状の形態に調整し、更に、この検出用ヌクレオチド鎖を、伸長状態のままで浮遊電極の表面部位に固定させていくことが可能となる。

【0020】

そして、更に前記対向電極に電圧を印加することによって、前記反応領域に存

在する前記標的ヌクレオチド鎖を伸長状態にして、前記対向電極及び前記浮遊電極の前記表面部位に固定させた前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせることが可能となる。なお、本発明に係るセンサーチップにおける前記対向電極によって形成される電界は、特に交流を採用することができる。

【0021】

更に、本願では、以下のハイブリダイゼーション方法を提供する。本方法は、検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、前記反応領域に配置された対向電極と、前記対向電極間に配設された複数の浮遊電極と、を備えた検出表面を用いる方法である。

【0022】

そして、前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記検出用ヌクレオチド鎖を伸長状態とし、この伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を前記対向電極及び前記浮遊電極の局所的な表面部位に生じる不均一電界で誘電泳動して、前記浮遊電極の前記表面部位に固定させる手順（第1手順）と、前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記標的ヌクレオチド鎖を伸長状態にして、前記浮遊電極の前記表面部位に固定された伸長状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせる手順（第2手順）と、を備える。

【0023】

この方法では、対向電極に電圧を印加することによって反応領域中に電界を形成することによって、該反応領域中に配設された浮遊電極の表面部位及び対向電極の表面部位に不均一電界を形成し、この不均一電界による誘電泳動の作用に基づいて、最初に、前記電極の表面部位に検出用ヌクレオチド鎖を伸長させながら固定する。

【0024】

続いて、前記同様の誘電泳動の作用に基づいて、前記反応領域に後添加されてきた標的ヌクレオチド鎖を伸長させながら、前記表面部位に固定されている伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖に接近させ、直鎖状同士のヌクレオチド鎖同士で、

より効率の良いハイブリダイゼーションを進行させることができる。

【0025】

以上の本発明は、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等において必須となるハイブリダイゼーションの検出を、効率良く実施できるハイブリダイゼーション検出部及び該検出部を備えるDNAチップ等のセンサーチップを、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の関連産業界に提供するという技術的意義を有している。

【0026】

ここで、本願における主な技術用語の定義付けを行う。本願において「ヌクレオチド鎖」とは、プリンまたはピリミジン塩基と糖がグリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステルの重合体を意味し、DNAプローブを含むオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プリンヌクレオチドとピリミジンヌクレオチドが重合したDNA（全長あるいはその断片）、逆転写により得られるcDNA（cDNAプローブ）、RNA、ポリアミドヌクレオチド誘導体（PNA）等を広く含む。

【0027】

「検出用ヌクレオチド鎖」は、前記対向電極や前記浮遊電極の直接的に又は間接的に固定化されるヌクレオチド鎖であり、「標的ヌクレオチド鎖」は、前記検出用ヌクレオチド鎖と相補的な塩基配列を備えるヌクレオチド鎖であって、場合によっては、蛍光物質等により標識されるものである。

【0028】

「ハイブリダイゼーション」は、相補的な塩基配列構造を備えるヌクレオチド鎖間の相補鎖（二重鎖）形成反応を意味する。

【0029】

「反応領域」は、液相中でのハイブリダイゼーション反応の場を提供できる領域である。この反応領域では、一本鎖ヌクレオチド間の相互反応、即ちハイブリダイゼーションに加え、検出用ヌクレオチド鎖から所望の二本鎖ヌクレオチドを形成し、該二本鎖ヌクレオチドとペプチド（又はタンパク質）の相互反応、酵素応答反応その他の分子間相互反応も行わせることができる。例えば、前記二本鎖

ヌクレオチドを用いる場合は、転写因子であるホルモンレセプター等のレセプター分子と応答配列DNA部分の結合等を分析することができる。

【0030】

「対向電極」は、反応領域内に少なくとも一对の相対向する電極であって、電圧が印加されたときに、反応領域に電界を形成する役割を発揮するものである。

【0031】

「浮遊電極」は、導電性を備え、外部電源に接続されていない孤立した電極を意味する。

【0032】

「立体障害 (steric hindrance)」は、分子内の反応中心等の近傍に嵩高い置換基の存在や反応分子の姿勢や立体構造 (高次構造) によって、反応相手の分子の接近が困難になることによって、所望の反応 (本願では、ハイブリダイゼーション) が起こりにくくなる現象を意味する。

【0033】

「誘電泳動」は、電界が一様でない場において、分子が電界の強い方へ駆動する現象であり、交流電圧をかけた場合も、かけた電圧の極性の反転につれて分極の極性も反転するので、直流の場合と同様に駆動効果が得られる (監修・林 輝、「マイクロマシンと材料技術 (シーエムシー発行)」、P37～P46・第5章・細胞およびDNAのマニピュレーション参照)。

【0034】

「センサーチップ」は、石英ガラスや合成樹脂等で形成された基板に物質間の相互反応作用を検出できる反応領域と該反応領域に設けられる対向電極に対する電圧印加手段を少なくとも備えるものを意味し、代表例としてDNAチップを挙げる事ができる。

【0035】

【発明の実施の形態】

以下、添付図面に基づいて、本発明の好適な実施形態について説明する。まず、図1は、本発明に係るハイブリダイゼーション検出部 (以下、「検出部」と略称する。) 及びセンサーチップの第1実施形態 (符号1a) の要部構成を表す図

である。

【0036】

検出部 1 a には、まず、反応領域 R が設けられている。この反応領域 R は、図 1 中において符号 X で示された検出用ヌクレオチド鎖と図示しない標的ヌクレオチド鎖を含む試料溶液が添加される貯留領域であって、ハイブリダイゼーションの反応の場を提供する領域又は空間である。

【0037】

この反応領域 R には、対向電極 A、B がその端面が平行になるよう配置されており、図示された電源 V に、スイッチ S を介して接続可能な状態に構成されている。また、対向電極 A、B 間には、複数の浮遊電極 C が電源 V には接続されない状態で、縦横方向に整列されて点在するように配設されている（図 1 参照）。なお、ここでは、各浮遊電極 C を円形状としたが、この形状に特に限定ものではなく、多角形、楕円等、不均一電界を形成させる任意の形状とすることができる。

【0038】

また、各浮遊電極 C の電極表面を、前記対向電極 A、B の電極表面よりも狭小に形成することによって、浮遊電極 C の電極表面に電界が集中し易くなり、不均一電界が形成され易くなるので好適である。

【0039】

なお、図 1 は、スイッチ S がオンされ、対向電極 A-B 間に電圧が印加されている状態を示しており、また、反応領域 R 中に示された符号 X は未だランダムコイル状に丸まっている状態の検出用ヌクレオチド鎖を表し、符号 X' は、直鎖状に伸長され、電極表面に固定された検出用ヌクレオチド鎖を表している。

【0040】

なお、検出部 1 a は、特に図示しないが、石英ガラスやシリコン、ポリカーボネート、ポリスチレン等の合成樹脂で形成された基板の間の狭小な間隙に設けられている。検出部 1 a では、対向電極 A、B 等の厚みと反応領域 R の深さ（又は幅）が一致し、場合によっては、誘電体によって各電極 A、B 等を挟持させた構成を採用し、これにより基板の間隔を広げ、反応領域 R の容量を増やすようにしてもよい（後述する第 2 実施形態でも同様）。

【0041】

ここで、図2は、前記検出部1aにおいて、図示されたスイッチSをオンにし、電源Vによって対向電極A-B間に高周波電圧を印加することによって、反応領域Rに電界Lが形成された状態を、電気力線を示すことで表している。電極A-B間に高周波電圧が印加されると前記反応領域Rには、符号Lで示された不均一電界が形成される。

【0042】

即ち、対向電極A、Bの電圧を印加すると、電極A、B及び各浮遊電極Cの表面部位に電界が局所的に集中する不均一電界Lが形成されることになる（図2参照）。この不均一電界Lの作用によって、前記反応領域R中にランダムに分散して存在している検出用ヌクレオチド鎖Xを、前記不均一電界Lに沿った方向に伸長させながら駆動させることができる。

【0043】

更に、前記検出用ヌクレオチド鎖Xは、誘電泳動の作用によって駆動されて、電界強度の強い電極A、B、Cの各表面部位に対して、伸長した状態でその一端が固定される。図1、図2は、各電極A、B、Cの表面部位に伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖X'が固定されている状態を示されている。

【0044】

なお、対向電極A、B間に印加される電界の条件は、約 1×10^6 v/m、約1MHzが好適である（Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol.26, No.26, p.1165-1172(1990)参照）。

【0045】

続いて、反応領域Rに後添加されてきた標的ヌクレオチド鎖は、対向電極A、Bにより形成された不均一電界Lの作用を受けて、上記検出用ヌクレオチド鎖X'と同様に伸長され、電界強度の強い電極A、B、Cの各表面部位に対して誘電泳動により引き寄せられる。

【0046】

前記各表面部位に引き寄せられた標的ヌクレオチド鎖は、同表面部位に既に固

定された伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖X'との間で、立体障害の影響を受けずに、効率の良いハイブリダイゼーションが進行する。

【0047】

なお、対向電極A、B並びに各浮遊電極Cの表面あるいは端部を、検出用ヌクレオチド鎖X'の末端部位がカップリング反応等の反応によって固定されるように表面処理しても良い。一例を挙げれば、ストレプトアビジンによって表面処理された電極表面の場合には、ビオチン化されたヌクレオチド鎖末端の固定に適している。

【0048】

次に、図3に基づいて、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第2実施形態（符号1b）の構成を説明する。

【0049】

まず、検出部1bには、上記した検出部1a同様に、反応領域Rと、該反応領域Rに対向電極A、Bが平行に配置され、電源Vにより接続可能な状態となっている。そして、対向電極A-B間には、電源Vには接続されていない複数の浮遊電極D群が配置されている。

【0050】

この第2実施形態の浮遊電極D群と上記第1実施形態の浮遊電極C群は、反応領域Rに点在するように配置されている点で共通しているが、検出部1aにおいては浮遊電極Cが縦横方向ともに整列されて配置されているのに対して（図1、図2参照）、検出部1bの浮遊電極Dは、互い違いに配置されている点で異なる（図3参照）。なお、図3においては、各浮遊電極Dを円形状としたが、この形状に特に限定ものではなく、多角形、楕円等、不均一電界を形成させる任意の形状とすることができる。

【0051】

以上説明した第1、第2実施形態では、浮遊電極C群又はD群を反応領域R内に間隔を置いて、いわばマトリックス状に点在させた結果、反応領域R内に電気力線が集中する箇所を多数形成することができ、反応領域R内に形成される電界の不均一性を強めることができるという利点がある。

【0052】

更に、浮遊電極Cが反応領域Rに点在するように配設されたことで、ヌクレチド鎖の自由な移動を確保しながら、反応領域R全域にわたってハイブリダイゼーションを進行させることができる。この結果、ハイブリダイゼーションを検出できる範囲が反応領域R全体に広がるので、検出感度が向上する。

【0053】

各浮遊電極C群又はD群の各電極の配置間隔は、特に限定するものではないが、伸長状態である検出用ヌクレオチド鎖X'の分子長の2倍以上とすることによって、隣接する電極C-C間あるいはD-D間において、検出用ヌクレオチド鎖X'の自由な移動を確保し、固定された検出用ヌクレオチドX'同士の干渉や立体障害を防ぐことができる。

【0054】

一方、各浮遊電極Cの配置間隔を伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖X'よりも短い間隔とすることによって、前記検出用ヌクレオチド鎖X'を浮遊電極C-C間に架橋するように固定することが可能となる。

【0055】

以下、添付した図4に基づいて本発明に係る「ハイブリダイゼーション方法」の実施例について説明する。図4は、同方法の手順を簡潔に示すフロー図である。

【0056】

まず、図4(A)は、反応領域Rに滴下された直後において、検出用ヌクレオチド鎖Xが丸まった状態で存在している段階を示している。この段階では、浮遊電極C(D)には、まだ検出用ヌクレオチド鎖は固定されていない。

【0057】

図4(B)、(C)は、本発明に係るハイブリダイゼーション方法の第1手順P₁を示している。まず、図4(B)は、図1～図3に図示された対向電極A-B間に電圧を印加し、浮遊電極C(D)の表面部位に電気力線が集中する不均一電界Lを形成し、検出用ヌクレオチド鎖Xを電気力線に沿って伸長させ、浮遊電極C(D)に引き寄せている段階を示している。図4(C)は、この段階を経て

、浮遊電極C（D）に対して、伸長された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'の一端が固定された段階を示している。

【0058】

続いて、図4（D）は、反応領域Rに標的ヌクレオチド鎖Yが添加されてきた段階を示している。この段階では、対向電極A-Bに対する電圧印加は停止され、標的ヌクレオチド鎖Yは丸まった状態にある。なお、反応領域Rに標的ヌクレオチド鎖Yを添加する段階においても、対向電極A-Bに対する電圧印加を継続させておいてもよい。

【0059】

次に、図4（E）、（F）は、本発明に係るハイブリダイゼーション方法の第2手順P₂を示している。まず、図4（E）は、再び対向電極A-B間に電圧を印加して、浮遊電極C（D）の表面部位に電気力線が集中する不均一電界Lを形成することにより、前記標的ヌクレオチド鎖Yを電気力線に沿って伸長させ、検出用ヌクレオチド鎖X'に引き寄せている段階である。

【0060】

図4（F）は、電圧印加がオフされた状態で、ともに伸長状態にある検出用ヌクレオチド鎖X'と標的ヌクレオチド鎖Y'が、ブラウン運動に委ねられてハイブリダイゼーションした段階を示している。

【0061】

本発明に係るハイブリダイゼーション方法では、対向電極A-B間に対する電圧印加は、図4（B）～（E）の段階にわたって、スイッチSをオンし続ける操作例やスイッチSのオン／オフを断続的に行う操作例のいずれも採用できる。

【0062】

電圧のオン／オフを所望の回数だけ繰り返し、断続的に電圧を印加することによって、検出用ヌクレオチド鎖X'の電極固定のタイミングを調整したり、あるいは既に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'に対して、反応領域R中の標的ヌクレオチド鎖を段階的に接近させたり、または標的ヌクレオチド鎖を前後に移動させたり、更には、反応のタイミングを調整したりすることが可能となる。

。

【0063】

また、電圧印加の際（特に図4（F）の段階）に、電圧オフとなる時間を確保することによって、直鎖状とされた標的ヌクレオチド鎖と直鎖状の検出用ヌクレオチド鎖X' との間の相補鎖形成反応、即ちハイブリダイゼーションを、専らブラウン運動に委ねて進行させることができる。

【0064】

以上の方法により、直鎖状に伸長されて電極に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X' と該検出用ヌクレオチド鎖X' と同様に直鎖状に伸長された標的ヌクレオチド鎖との相補性のある塩基間の水素結合の形成、即ちハイブリダイゼーションが、立体障害の問題もなく、効率良く進行し、反応時間が短縮されるとともに、擬陽性又は偽陰性を示す確率も減少するという好ましい結果が得られる。

【0065】

なお、ハイブリダイゼーションの検出は、慣用の方法によって実施でき、例えば、標的ヌクレオチド鎖Yに標識された蛍光色素や二重鎖ヌクレオチドの塩基間に特異的に結合するPOPO-1やTOTO-3等の蛍光インターカレータに励起光を照射し、得られる蛍光を慣用のディテクタを用いて検出できる。

【0066】

より具体的には、レーザー光（例えば、青色レーザー光）を照射して反応領域Rを励起し、蛍光強度の大きさを検出器（図示せず。）によって検出し、検出用ヌクレオチド鎖X' と標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの状態を判断する。最後に、各反応領域Rに対する蛍光強度をA/D変換し、結合反応割合をコンピュータCの画面に分布表示することによって、視覚化することができる。なお、本発明において、ハイブリダイゼーションの検出方法は、特に限定されることはない。

【0067】**【発明の効果】**

本発明は、DNA等のセンサーチップ表面部位においてハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域全体に、伸長状態に調整された検出用ヌクレオチド鎖を固定させることによって、ハイブリダイゼーション効率の向上、反応時間の

短縮、検出感度の向上、偽陽性又は偽陰性の発生防止等を確実に達成できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係るハイブリダイゼーション検出部及びセンサーチップの第 1 実施形態 (1 a) の要部構成を表す図

【図 2】

同検出部に不均一電界 (L) が形成された様子を示す図

【図 3】

本発明に係るハイブリダイゼーション検出部及びセンサーチップの第 2 実施形態 (1 b) の要部構成を表す図

【図 4】

本発明に係るハイブリダイゼーション方法の実施例手順を簡潔に示すフロー図

【符号の説明】

1 a, 1 b ハイブリダイゼーション検出部

A, B 対向電極

C, D 浮遊電極 (群)

R 反応領域

S スイッチ

V 電源

P₁ 第 1 手順

P₂ 第 2 手順

X 検出用ヌクレオチド鎖

X' 伸長状態とされた検出用ヌクレオチド鎖

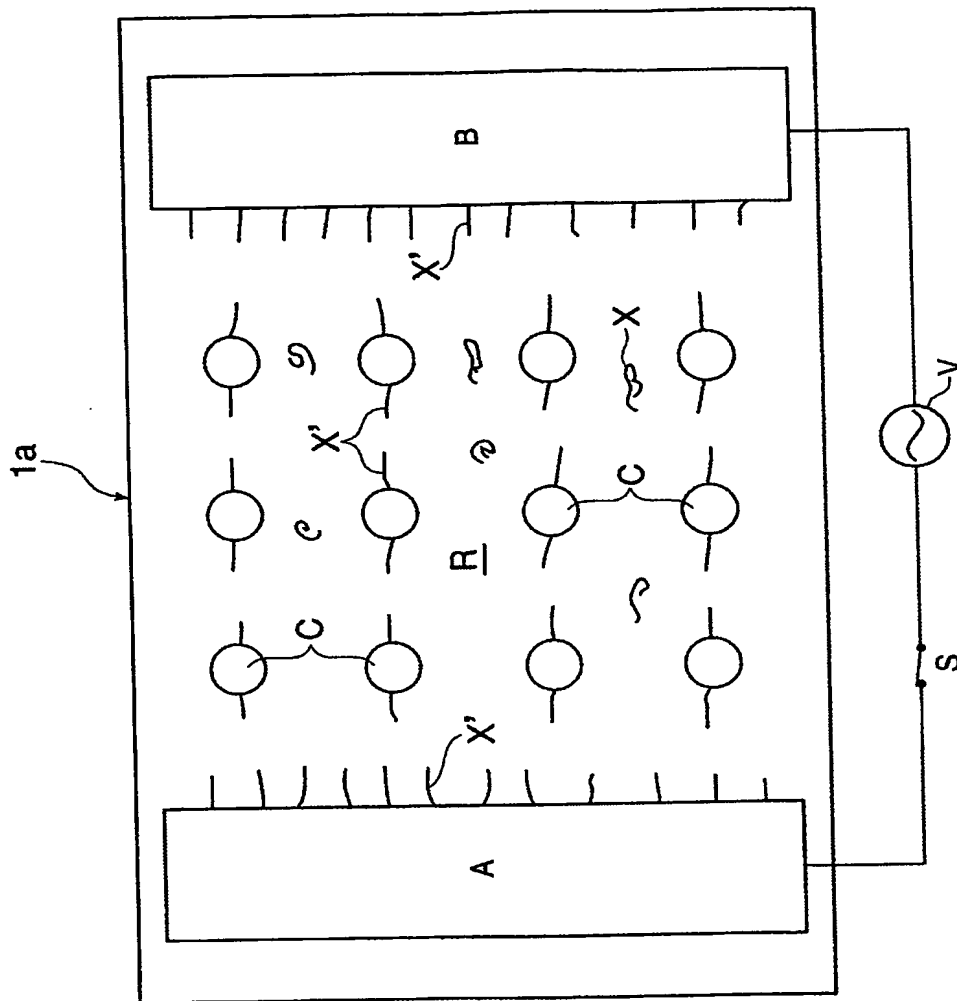
Y 標的ヌクレオチド鎖

Y' 伸長状態とされた標的ヌクレオチド鎖

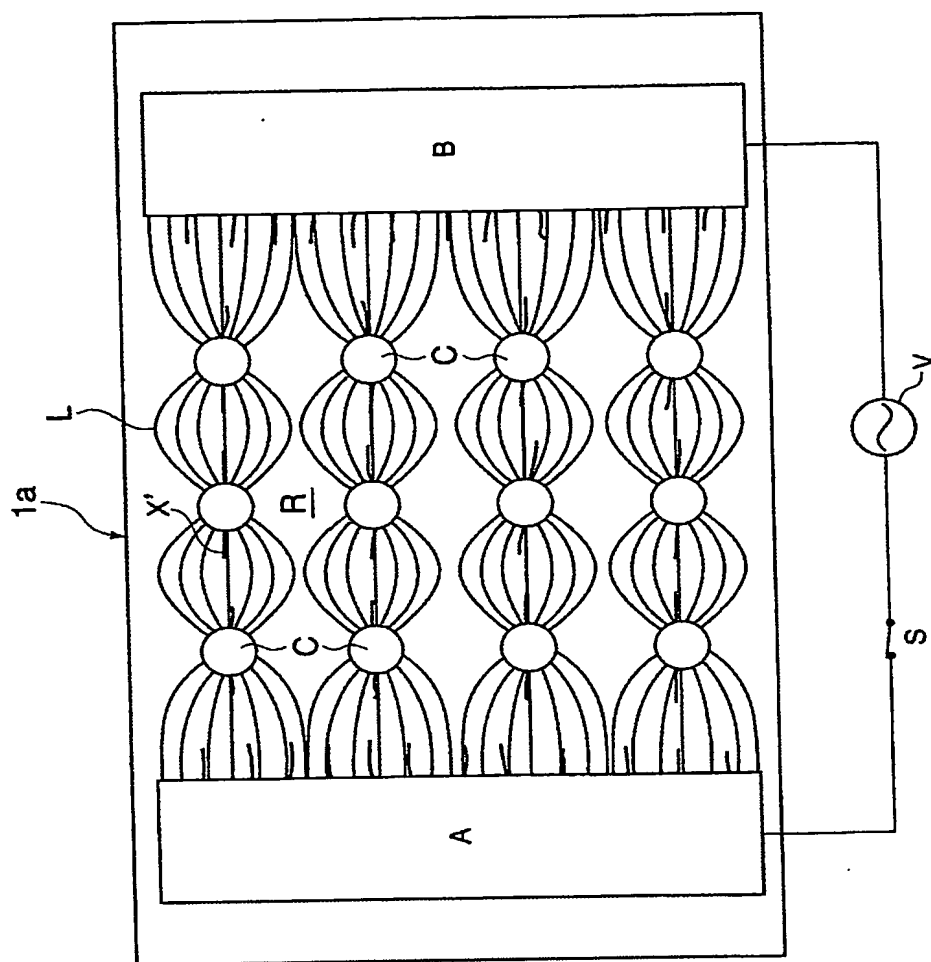
【書類名】

図面

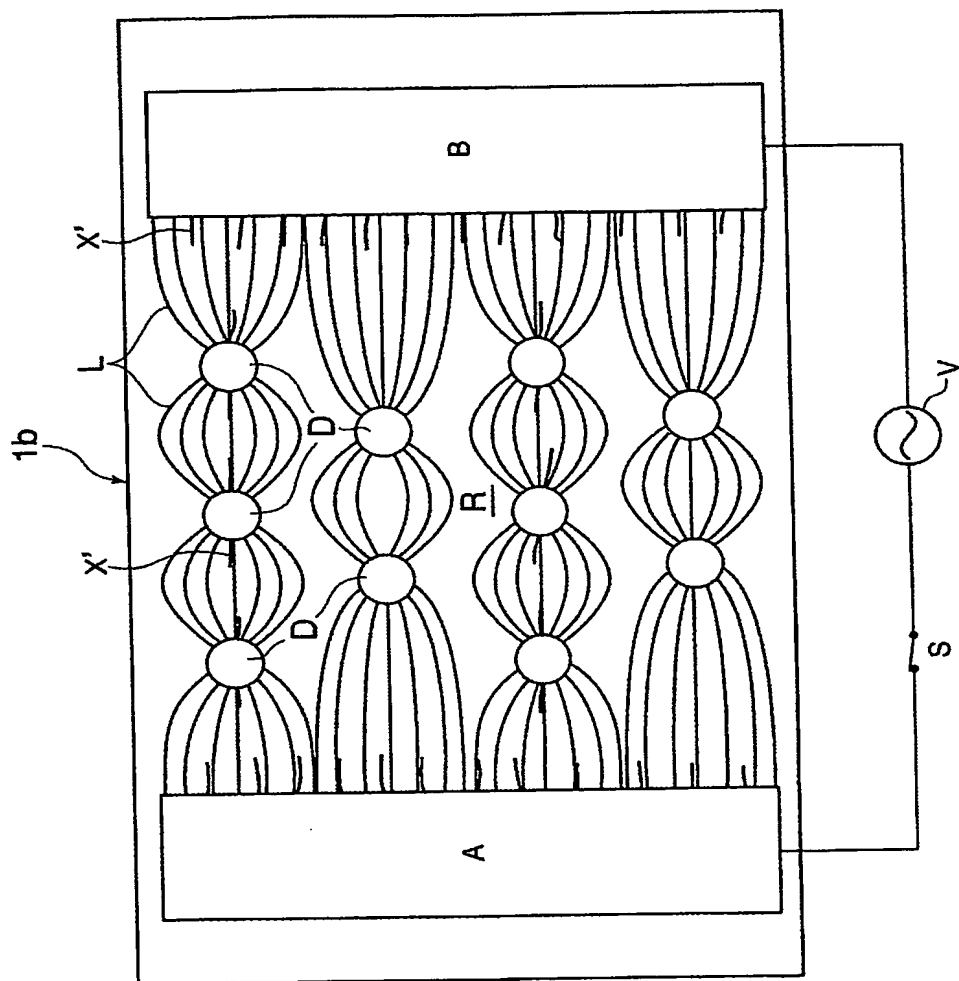
【図 1】



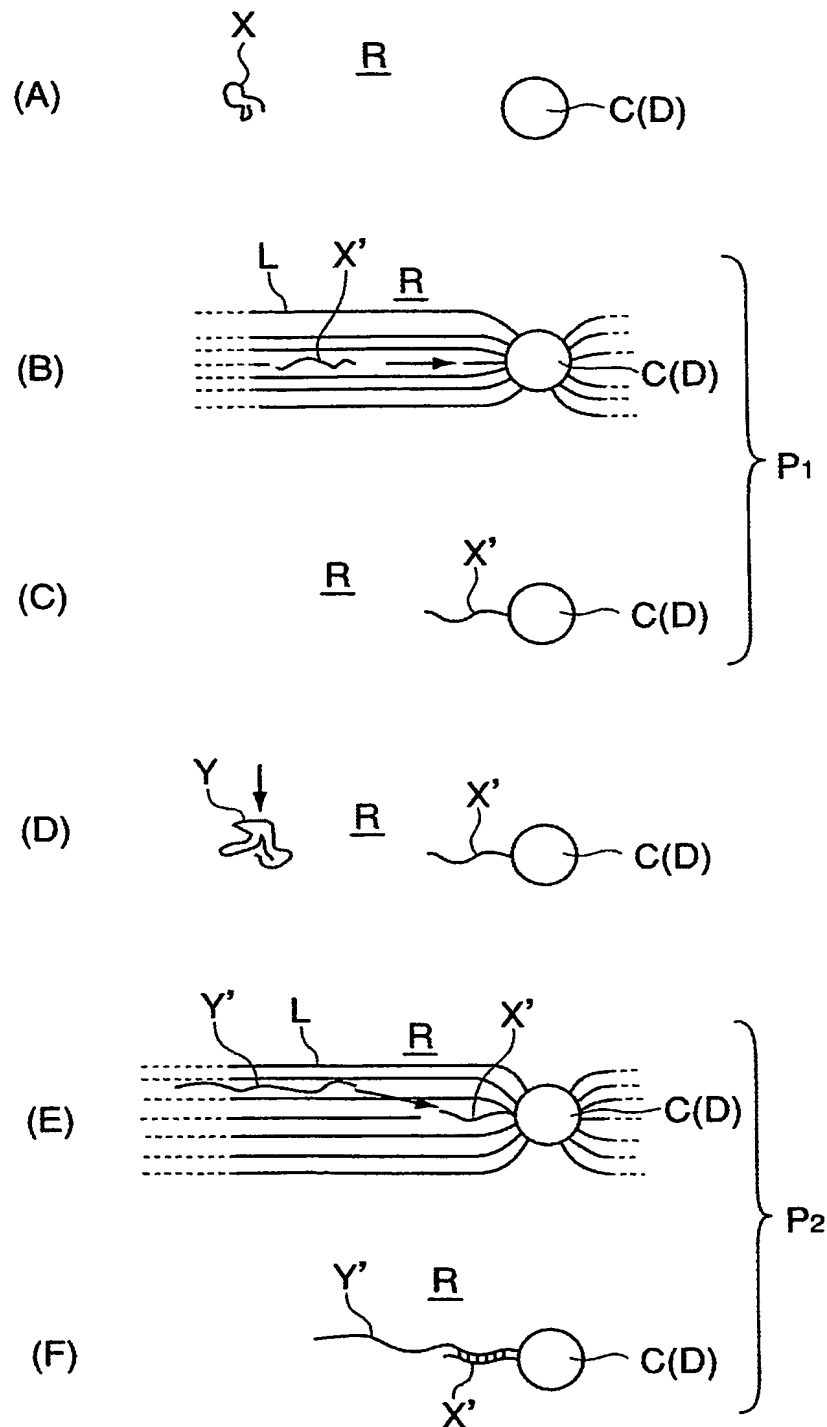
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を反応領域全体に固定させるように工夫することによって、ハイブリダイゼーション効率の向上を図る。

【解決手段】 検出用ヌクレオチド鎖Xと該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を有する標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域Rと、前記反応領域Rに配設された対向電極A、Bと、前記対向電極A-B間に点在するように配置された浮遊電極Cと、を備えるハイブリダイゼーション検出部1a及び該検出部1aが形成されたセンサーチップ並びに該検出部1aで行うハイブリダイゼーション方法を提供する。

【選択図】 図1

特願 2002-294796

出願人履歴情報

識別番号

[000002185]

1. 変更年月日

1990年 8月30日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都品川区北品川6丁目7番35号

氏 名

ソニー株式会社